Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini

Die Bedeutung der Hydroxyprolinausscheidung für die Diagnostik von Erkrankungen mit erhöhtem Kollagenumsatz

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Elisabeth Olschewski, geb. Kovarik

aus Preßburg

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini

Die Bedeutung der Hydroxyprolinausscheidung für die Diagnostik von Erkrankungen mit erhöhtem Kollagenumsatz

UNIV. LIBRARY MARBURG

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Elisabeth Olschewski, geb. Kovarik

aus Preßburg

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. W. Straub
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. G. Strohmeyer
Correferent: Prof. Dr. med. G. A. Martini

Inhaltsverzeichnis:

I.	Einleitung	Seite 1 - 12
II.	Hauptteil	Seite 13 - 33
	1. Material und Methode	Seite 13 - 16
	2. Normalwerte	Seite 16 - 19
	3. Hyperthyreose	Seite 20 - 22
	4. Uramie	Seite 23 - 26
	5. Progr. chron. Polyarthritis	Seite 27 - 28
	6. Malabsorptionssyndrom	Seite 29 - 30
	7. Immobilisierte Patienten	Seite 30 - 33
III.	Diskussion	Seite 34 - 39
IV.	Zusammenfassung	Seite 40 - 41
V.	Literaturverzeichnis	Seite 42 - 48

I. Einleitung

a) Kollagenstoffwechsel

Die renale Ausscheidung der Aminosäure Hydroxyprolin hat großes klinisches Interesse gefunden als Indikator für die Höhe des Kollagenumsatzes. Dieses Molekül ist nämlich fast nur im Kollagen vorhanden, nur geringe Mengen von 2 % kommen im Elastin vor (3), sonst wird es in keinem Körper-Protein gefunden.

Zur Entstehung von Hydroxyprolin aus Prolin:

Die erste Antwort auf die Frage der Entstehung von Hydroxyprolin aus Prolin gab Stetten (4), als er versuchte, Hydroxyprolin ins Kollagen einzufügen. Beim Verfüttern von N 15 - Markiertem Prolin fand man im Kollagen sowohl markiertes Hydroxyprolin als auch markiertes Prolin. Fütterten die Verfasser jedoch markiertes Hydroxyprolin, dann wurde das Kollagen-Hydroxyprolin nicht markiert. Damit war gezeigt:

1. dass Hydroxyprolin aus Prolin entsteht und
2. dass freies Hydroxyprolin nicht der Ursprung des im Kollagen enthaltenen Hydroxyprolin war.

Es gab viele Überlegungen darüber, auf welche Weise Prolin in Hydroxyprolin ohne Zwischenstufe des freien Hydroxyprolin umgewandelt wird.
Mit Hilfe von Hühnerembryonen und markiertem Sauerstoff zeigten Prockop et al (5), daß die Bildung von Hydroxyprolin auf einer direkten Addition von Sauerstoff an Prolin durch einen Oxygenase-Mechanismus beruht. Das Produkt dieser Reaktion ist nicht freies, sondern peptidgebundenes Hydroxyprolin.

Um das Prolin zu hydroxylieren und in das Peptid einzubauen, ist eine Energiequelle wie Adenosin-Triephosphat oder Kreatinin-Phosphat nötig. Das zeigten Versuche von Peterkofsky und Udenfrend (6), wobei in einem zellfreien System von 8 Tage alten Hühnerembryonen für die Umwandlung von markiertem Prolin in Kollagen-Hydroxyprolin die Mikrosomen zur Aktivierung notwendig waren. Ausserdem sind ein bestimmter PH-Wert und Sauerstoff Wichtig. Da ein RNS-Hydroxyprolin nie beobachtet wurde, geschieht die Hydroxylierung des Prolin offenbar jenseits des ribosomalen Stadiums der Protein-Synthese. (6)

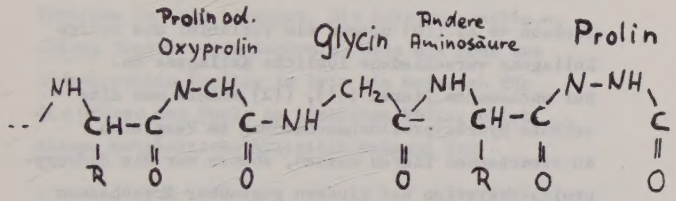
Das hydroxylierende Enzym und das Protein-Substrat wurden in den Mikrosomen lokalisiert (6). Es scheint also, als ob die Mikrosomen einen Kollagen-Vorläufer bilden, ein Prolin enthaltendes Makromolekül, das in Gegenwart von Sauerstoff und Ascorbinsäure zu Hydroxyprolin hydroxyliert wird (7).

Bis jetzt sind 14 Hydroxyprolin-Peptide im Urin isoliert worden. 1 - 4 % werden als freies, 95 % als peptidgebundenes Hydroxyprolin ausgeschieden. Davon macht das Dipeptid Prolyl-Hydroxyprolin60 % aus, das Tripeptid Glycyl-Prolyl-Hydroxyprolin 15 % (7)

b) <u>Aufbau des Kollagens:</u>

Kollagen und Elastin sind fibrilläre Proteine, die sich aus Bündeln paralleler Polypeptidketten unbestimmter Länge, die ihrerseits durch Querverbindungen gehalten sind, aufbauen. So entstehen Fibrillen, die sich zu den histologisch darstellbaren Faserstrukturen zusammenlegen.

Ein Monomer besteht aus drei spiraligen Polypeptidketten, die umeinander gewunden sind und eine Superhelix ergeben (15 $\overset{\circ}{A}$ ⌀ und 2800 $\overset{\circ}{A}$ Länge). In den Fibrillen sind die Moleküle End - zu - End und Seit - zu - Seit polymerisiert. Am Aufbau der Kollagenfibrillen sind hauptsächlich Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und basische Aminosäuren beteiligt. Es fehlen fast völlig Tyrosin, Cystin und Tryptophan. Ob die Kollagene der verschiedenen Organe völlig identisch sind, ist noch eine offene Frage. Es scheint, als ob jede dritte Aminosäurerest Glycin oder Prolin ist, und dass man sich die Peptidketten durch Wiederholung der folgenden Grundeinheit denken kann (8):



c) Herkunft des Hydroxyprolin im Urin aus Kollagen-Vorstufen oder reifem Kollagen?

Nach Neumann und Logan (2) beträgt im Kollagen der Anteil des Hydroxyprolin an den gesamten Aminosäuren 13,5 %. Die Ausscheidung erfolgt in freier und in gebundener Form, wobei die Ausscheidung derfreien Aminosäure, wie oben angegeben, 4 % der totalen Hydroxyprolinausscheidung ist. Die Frage, ob das bei erhöhtem Proteinstoffwechsel, besonders bei gesteigertem Knochenumsatz vermehrt ausgeschiedene Hydroxyprolin vom Abbau des reifen Kollagens oder von dem Ausmass derKKollagenbildung abhängig ist, lässt sich wohl noch nicht endgültig beantworten.

Man vermutet einerseits aufgrund von Tierexperimenten, dass die Höhe des ausgeschiedenen Hydroxyprolin die Menge des löslichen Kollagen im Körper wiederspiegelt. Der Nachweis von erhöhter Hydroxyprolinausscheidung bei Hyperparathyroidismus, bei M. Paget, bei sowohl osteoklastischen als auch osteoblastischen Knochen-Carcinomen und nach Gabe von Parathyroidea-Extrakt stimmt andererseits mit der Hypothese überein, dass der Hydroxyprolinspiegel das Ausmass des Knochenabbaus reflektiert. So auch H. E. Firschein in Arch. Biochem. and Biophys. 119, 119 (1967). (9)

Jackson et al (10) nehmen als Vorläufer des reifen Kollagens verschiedene lösliche Kollagene an. Bei wachsenden Tieren (11), (12) konnte man eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung im Vergleich zu erwachsenen Tieren messen, ebenso war die Hydroxyprolin-Exkretion bei Kindern gegenüber Erwachsenen erhöht (13). Entsprechend fanden Jasin und Mitarbeiter (14) einen erniedrigten Hydroxyprolinspiegel bei nicht wachsenden Kindern. Von verschiedenen Autoren,(15), (16), (17),wurde nun eine Relation zwischen Wachstumsrate und Grösse des löslichen Kollagen-Pools nachgewiesen. Demnach ist die Höhe der Hydroxyprolin-Peptide im Urin abhängig von der Höhe des metabolisch aktiven, löslichen Kollagen-Pools. Jasin und Ziff (14) beschrieben einen Versuch, bei dem sie die Erhöhung des extrahierbaren,in Neutralsalz löslichen Kollagen der Haut verschiedener Tierarten massen, denen sie ein Lathyrismus erzeugendes Mittel gegeben hatten.Osteolathyrismus ist eine Erkrankung, bei der Knochendeformierungen und Aortenaneurysmen beobachtet werden- hervorgerufen bei Tieren durch

Fütterung mit Samen von Lathyrus odoratus, der spanischen Wicke. Der Lathyrismus kann als Erkrankung bei Tieren dem Marfan-Syndrom beim Menschen gegenübergestellt werden. Umstande also, unter denen nicht das Wachstum der primäre Faktor ist,der den Pool vergrössert. Die Synthese von totalem Kollagen wuchs dabei nicht an; so auch Levence (18) und Dasler (19). Das Ergebnis der Versuche war, dass das totale Kollagen in der Haut von Ratten mit Lathyrismus im Vergleich zu Kontrollgruppen nicht erhöht war. Die Fraktion des löslichen Kollagen war dagegen erhöht und parallel dazu die Ausscheidung von Hydroxyprolin-Peptiden im Urin vermehrt. Die Autoren erachte n dieses Ergebnis als Nachweis, dass die Höhe der Hydroxyprolin-Peptide im Urin ein Massstab für die Grösse des Pools an löslichem Kollagen ist, dessen metabolische Aktivität bekannt ist.

Zur Frage, ob das lösliche Kollagen tatsächlich die Vorstufe des unlöslichen Kollagen darstellt, beschreibt Harkness (20) seine diesbezüglichen Versuchsergebnisse. Er teilte die Haut wachsender Ratten in vier Fraktionen auf:

1. Material, das in Phosphat-Puffer löslich war,
2. Proteine, die sich nicht in Phosphat-Puffern, aber in Citrat mit einem pH von 3,8 lösten,
3. Kollagen, das bei den Prozeduren nicht gelöst wurde,
4. Unlöslicher Rest.

1. Das phosphatlösliche Material erwies sich als ein Gemisch von Zell- und Plasmaproteinen aus dem Extrazellulärraum mit wenig Kollagen ("alkalilösliches" Kollagen).
2. Die citratlösliche Fraktion bestand aus kollagen-

ähnlichem Material, genannt "säurelösliches" Kollagen oder Prokollagen (Orekhovich). Die Mengen von Hydroxyprolin, Glycin und Tyrosin waren in den drei Kollagenfraktionen ähnlich. Es scheint also die Menge des vorhandenen löslichen Kollagen mit der Ausscheidung von Hydroxyprolin im Urin parallel zu gehen. Wachstumshormon bewirkt durch seine Wirkung auf das metabolisch aktive lösliche Kollagen eine Erhöhung der Exkretion von Hydroxyprolin im Urin (21).

Nicht nur unter Bedingungen, die eine erhöhte Synthese von Kollagen bewirken, sondern auch unter solchen, die mit einem vermehrten Abbau von Kollagen verbunden sind, sieht man einen Anstieg des totalen Urin-Hydroxyprolin, wie auch das Wachstumshormon gleichzeitig auf das lösliche Kollagen und auf den Umsatz von reifem Kollagen wirkt. Wenn auch die Fraktion des reifen Kollagen nur sehr langsam umgesetzt wird, (20), ist sie doch in grosser Menge vorhanden. Besonders in erwachsenen Geweben findet sich wenig lösliches Kollagen, so dass der Beitrag von reifen Fasern zur Höhe des Urin-Hydroxyprolin zwangsläufig relativ grösser wird. Laitinen (22): Studien mit C 14 - Protein ergaben, dass das freie und totale Urin-Hydroxyprolin sowohl vom gerade synthetisierten Kollagen-Molekül, dem sogenannten löslichen Kollagen des Gewebes stammt, als auch vom Katabolismus der reifen, unlöslichen Kollagenfasern.

II. Krankheiten mit vermehrter Hydroxyprolinausscheidung.

Die Krankheiten, die nach den bisherigen Erfahrungen eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung zur Folge haben, lassen sich in folgende Gruppen gliedern:

Endokrine Erkrankungen, andere Krankheiten mit grossem Knochenumsatz, Kollagenerkrankungen.

Zur ersten Gruppe gehören:
Die Hyperthyreose
Der Hyperparathyroidismus
Die Akromegalie
Das Turner-Syndrom

In dieser Gruppe werden die bemerkensten Abweichungen gefunden, abhängig von der Tatsache, dass Kollagensynthese, Reifung und Abbau hormonal gesteuert werden.

1. Endokrine Störungen:

Hyperthyreose:
Die Veränderungen in der Hydroxyprolinausscheidung bei Schilddrüsenerkrankungen sind abhängig vom Schilddrüsenhormon mit seiner Wirkung auf den Kollagenstoffwechsel. Nach Kivirikko (23) sind sowohl freies als auch gebundenes Hydroxyprolin im Urin und das freie Hydroxyprolin im Serum erhöht. Die statistisch signifikante Korrelation zwischen den Werten von Hydroxyprolin und dem proteingebundenen Jod im Serum macht die Methode wertvoll zur Diagnose und Therapiekontrolle der Hyperthyreose.

Hyperparathyroidismus:
Aufgrund der Wirkung des Parathormons auf die Vermehrung des Knochenabbaus sind bei Veränderungen in der Funktion der Nebenschilddrüse Veränderungen in der Hydroxyprolinausscheidung zu erwarten. Keiser et al(24) veröffentlichten 1964 folgende Versuchsergebnisse:

Eine gesunde Frau und drei Frauen mit chirurgisch bedingtem Hyperparathyroidismus wurden 10 - 12 Tage lang mit Parathyroidea-Extrakt, 600 U/ die intramuskulär, behandelt. Am ersten Tag des Versuches stieg der Hydroxyprolinwert im Urin bei der gesunden Frau von normal 29 mg/ Tag auf 46 mg/ die, das entspricht einem Anstieg von 67 %. Der Wert stieg weiter kontinuierlich mit einem Maximum am 7. Tag an (66 mg/ die = 140 % Anstieg). Bei beiden Gruppen näherte sich nach Absetzen des Extraktes schon am ersten Tag die Hydroxyprolinausscheidung dem Normalwert. Entsprechend war die Beobachtung bei Patienten mit Hyperparathyroidismus: Gegen einem Normalwert von 19 mg/ die der Kontrollgruppe fand sich ein Höchstwert von 49 mg/ die, das sind 152 % mehr.

Der rapide Abfall von Hydroxyprolin im Urin nachdem der Parathyroidea-Extrakt abgesetzt war liess vermuten, dass bei Suppression der Nebenschilddr üse durch Ca-Gabe der gleiche Effekt zu erwarten sei. Deshalb massen die Autoren in einem zweiten Versuch die Hydroxyprolinausscheidung während und nach einer Ca-Jnfusion. Die Messungen entsprachen den Vermutungen. Das Hydroxyprolin fiel während der vier Stunden der Ca-Jnfusion deutlich ab und blieb während der nächsten 12 Stunden niedrig. 24 Stunden nach der Infusion kehrten die Werte in den Normalbereich zurück. Bei Patie nten mit Hypoparathyroidismus hat die Ca-Infusion auf die Hydroxyprolinausscheidung keinen Einfluss - was beweist, dass die Ca-Infusion über eine Dämpfung der Nebenschilddrüsenaktivität in den Hydroxyprolinstoffwechsel eingreift.
Man kennt den direkten Einfluss von Parathormon auf die Knochenresorption - die sowohl den Verlust von Knochenmatrix als auch von Knochensalzen

einschliesst. Es steht zwar fest, dass das Parathormon über den Abbau von Knochen mit Hilfe von Osteoklasten die Hydroxyprolinvermehrung bewirkt (30 - 40 % des gesamten Kollagens sind in der Knochenmatrix eingebaut), aber es ist noch nicht klar, ob das Kollagen der organischen Matrix verändert wird, bevor oder nachdem die Salze daraus entfernt sind. Die Hypercaciurie geht jedenfalls der vermehrten Ausscheidung von Hydroxyprolin bei immobilisierten Patienten voraus. Besonders interessant ist dieses Problem im Zusammenhang mit der periosteocytären Osteolyse (Belanger et al) und Calciolyse (Bohatirchuk), die neuerdings neben der Osteoklasie wieder starke Beachtung findet. (Zit. nach H. Gossmann, G. Baltzer und H. Helms: Ca-Stoffwechsel bei chronischer Niereninsuffizienz. Histologische Befunde am Knochen. Klin. Wochenschrift, in Druck). (25).

Klein et al (26) untersuchten Patienten mit Parathyroidea-Adenomen mit und ohne Knochenläsionen. Sie fanden hohe Urin-Hydroxyprolinwerte beiden Patienten mit Knochenläsionen? während bei den Patienten ohne Knochenläsionen Normalwerte gefunden wurden. Gleichzeitig verfolgten die Autoren das Verhalten der alkalischen Serumphosphatase und fanden ihr Verhalten parallel zum Verhalten des Hydroxyprolin. Da die Erhöhung der alkalischen Serumphosphatase ein Anzeichen für erhöhte osteoblastische und vielleicht fibroblastische Aktivität (27) und somit auch der Kollagenbildung ist, stellt sich wiederum die oben erörterte Frage, ob das erhöhte Hydroxyprolin im Urin eine Kombination von Knochenresorption und Knochensynthese anzeigt.

Interessant ist die Meinung von Johnston (28), nach der bei fehlender Hypophyse die Antwort auf

die Injektion von Parathyroidea-Extrakt ausbleibt. Dazu massen die Autoren die Wirkung von Nebenschilddrüsen-Extrakt mit und ohne Wachstumshormon (ein Patient mit Akromegalie, ein Patient mit Panhypopituitarismus). Bei beiden blieben die Hydroxyprolinwerte im Urin nach Parathyroid-Extrakt normal. Wahrscheinlich waren diese Ergebnisse durch eine Nebennierenrindeninsuffizienz bedingt!

Akromegalie:

Ziff et al (29) vermuteten schon 1956, dass die mit dem Wachstum verbundene erhöhte Ausscheidung von Hydroxyprolin Peptide darstellt, die vom löslichen Kollagen stammen.

Es ist bekannt, dass die Hydroxyprolinausscheidung bei Kindern signifikant höher ist als bei Erwachsenen. Die höchsten Werte fanden die Verfasser bei Kindern von 0 - 1 und von 10 - 14 Jahren, also in Perioden starken Wachstums. Dull et al (30) fanden bei fünf Kindern eine tägliche Hydroxyprolinausscheidung von 27 - 96 mg gegenüber 8 - 31 mg bei fünf Erwachsenen. U. Langness und H. Behnke (31) beschreiben gegenüber einem Wert von durchschnittlich 22,5 mg Hydroxyprolin/ die bei Erwachsenen eine Ausscheidung von durchschnittlich 59,08 mg/die mit Schwankungen zwischen 20,2 und 96,3 mg bei Kindern und Jugendlichen. Kinder mit Zwergwuchs zeigen eine erniedrigte Ausscheidung von Hydroxyprolin-Peptiden. Jasin et al (32) gaben Wachstumshormon an zwei Kinder mit hypophysärem Zwergwuchs, was einen prompten Anstieg der Hydroxyprolinausscheidung zur Folge hatte. Nach Absetzen des Wachstumshormons fielen die Werte wieder auf den Ausgangspunkt ab. Die gleichen Verfasser beobachteten

einenPatienten mit Akromegalie, der eine deutlich erhöhte Menge von Hydroxyprolin ausschied. Nach einer Strahlentherapie fielen die Werte zur Norm ab. Bei fünf Patienten mit klinisch inaktiver Akromegalie war in einem Fall die Hydroxyprolinausscheidung deutlich vermehrt, die übrigen lagen an der äusseren Normgrenze. Man nimmt, wie schon oben beschrieben (21), in den Geweben wachsender Individuen eine erhöhte menge von löslichem Kollagen an als Folge der gesteigerten Synthese dieses Proteins. Diese Fraktion hat eine hohe Umsatzrate und ist der Vorläuferdes fibrillären Kollagen.

2. Krankheiten mit grossem Knochenumsatz:

Morbus Paget
Osteogenesis imperfecta
Knochenmetastasen

Morbus Paget:
Verschiedene Autoren geben in gleicher Weise extrem hohe Werte der Hydroxyprolinausscheidung im Urin bei Morbus Paget an. So Ziff et al (29) und Dull et al (30), die als Höchstwert bei einem Patienten 116 mg Hydroxyprolin/ die angeben.

Osteogenesis imperfecta:
Bei der Osteogenesis imperfecta handelt es sich nach Bauer (33) und Follis (34) um eine Verminderung und eine Funktionsstörung der Osteoblasten. Statt der regulären Kollagenfasern findet man Retikulinfasern. Nach Dull (35) ist die Hydroxyprolinausscheidung jedoch signifikant erhöht. Nach Frost besteht ein hoher Knochenumsatz. Auch Langness und Behnke (31) stellten bei 16 von 20 Patienten mit Osteogenesis imperfecta eine signifikante Erhöhung des Hydroxyprolin im Urin fest.

Eine Erhöhung der Hydroxyprolinausscheidung findet man ebenso bei Knochenmetastasen und zwar besteht kein Unterschied zwischen osteolytischen und osteoblastischen Carcinomen (Warren, 36).

3. Kollagen-Erkrankungen:

Die sogenannten Kollagen-Erkrankungen verursachen nicht eine statistisch signifikante Veränderung in der Hydroxyprolinausscheidung. Dies ergeben die Untersuchungen von Ziff (29) an Bindegewebserkrankungen wie rheumatischer Arthritis, Lupus erythematodes und Sklerodermie. Demgegenüber F. Hartmann (37): 25 Patienten mit Erkrankungen aus dem "rheumatischen Formenkreis" zeigten eine statistisch signifikante Erhöhung der Hydroxyprolinausscheidung gegenüber 20 gesunden Kontrollpersonen. Einschränkend bemerkt der Verfasser, dass bei nicht akutem bzw. ganz umschriebenem Entzündungsprozess die Hydroxyprolinausscheidung normal sein kann. Der Verfasser hält es für wahrscheinlich, dass im Bereich des rheumatischen Frühinfiltrates eine Faserausreifungsstörung eintritt und dass im Bereich dieser fibrinoiden Nekrosen vermehrt Kollagenvorstufen durch Enzyme abgebaut werden. Erst in zweiter Linie wäre an den Abbau reifer kollagener Fasern zu denken.

Hauptteil

I. Methoden:

1. Ältere Bestimmungsverfahren:

Als erster veröffentlichte Lang (38) 1933 eine analytische Methode zur Hydroxyprolinbestimmung, die auf einer Oxydation des Hydroxyprolin zu Pyrrol beruhte. Die Anzahl der Modifizierungsvorschläge, die in den nachsten drei Jahrzehnten veröffentlicht wurden, (2, 39, 40, 41, 42), zeigen die Schwierigkeiten auf.

Fast alle Methoden beruhten auf der Oxydation der Iminosäure zmuPyrrol-2-Carboxylsäure oder Pyrrol und der folgenden Bildung einer Farbsubstanz mit p-Dimethylaminobenzaldehyd. Die Ergebnisse zeigen jedoch bei Bestimmungen im Urin oder anderen ungereinigten Lösungen wegen der Schwierigkeit, das Ende des Oxydationsprozesses genau festzulegen, eine grosse Streubreite. Andere oxydierende Substanzen verringerten die Menge des Pyrrol stark (41), während andererseits bei einem sicherheitshalber gegebenen Überschuss des Oxydationsmittels das Produkt polymerisierte (44). Ein zweites Problem war, dass die vorhandenen Pigmente die Farbreakion erheblich stören konnten (39).
Alle diese Fehlerquellen möglichst auszuschalten bemüht sich die Methode von Prockop und Udenfriend.

2. Von uns angewandte Methode:

Die von uns ausgeführten Versuche wurden nach der von D. Prockop und S. Udenfriend (43) in "Analytical

Biochemistry", 1 (1960) 228 - 39 beschriebenen Methode durchgeführt. Damit können Mengen von weniger als 0,01 % Hydroxyprolin in Proteinhydrolysaten und von weniger als 2 mg/ml Hydroxyprolin im Urin quantitativ bestimmt werden. Bei dieser Methode wird das Hydroxyprolin bei Anwesenheit eines Überschusses an Alanin oxydiert. Die Spezifität wird dadurch gewährleistet, dass das Pyrrol in Toluol extrahiert wird. Die ersten Oxydationsprodukte (1-pyrrolin-4-hydroxy-2-carboxylsäure und pyrrol-2-carboxylsäure (7)) sind in Toluol nicht löslich; Stoffe, die die Farbreaktion stören, werden also vor der Bildung von Pyrrol mit Toluol entfernt. Dadurch ist es möglich, noch eine Menge von 5 mg Hydroxyprolin in einer Lösung, die mehr als 50 mg anderer Aminosäuren enthält, zu bestimmen.

A Hydrolyse

Für die Bestimmung von Hydroxyprolin im Urin (oder anderen komplexen Lösungen) werden 0,1 bis 1,0 ml (wir nahmen 1 ml) Urin in ein zum Autoklavisieren verschliessbares Röhrchen gefüllt. Das Volumen wird mit Wasser auf 2 ml ergänzt, dazu kommen 2 ml konzentrierte HCl. Anschliessend wird drei Stunden lang bei 105° C und 1 Atü im Dampftopf autoklavisiert.

B Praecipitation von Pigmenten und Neutralisation:

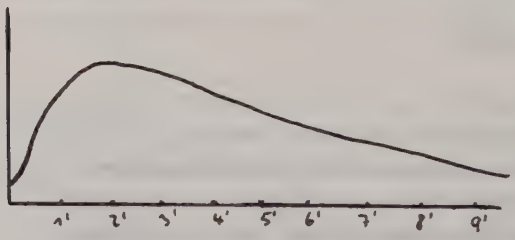
Die hydrolysierte Flüssigkeit wird in einem graduierten Zentrifugenröhrchen mit aqua dest. auf 8 ml angefüllt. Die HCl-Konzentration sollte dann 2 - 6 N sein. Danaben läuft die Standard-Serie mit 10, 2o und 30 γ Hydroxyprolin je Röhrchen, aufgefüllt auf 8 ml. Hinzugefügt wird nun 1 ml eines

Resin (Kationenaustauscher) - Kohle - Gemisches im Verhältnis 2 : 1. Der Inhalt der Gläschen wird gerührt und anschliessend 10' lang bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. 2 - 4 ml des klaren Überstandes werden in ein grösseres, verschliessbares Röhrchen gefüllt; mit 1 Tropfen einer 1% Phenolphthaleinlösung pro Glas als Indikator wird das pH durch Zusatz von zuerst 10 n, dann 0,1 n KCl-Lösung auf eine zartrosa Farbe eingestelllt. Dann kühlt man auf Zimmertemperatur ab. Mit Hilfe von Indikatorpapier oder des pH-Meters brachten wir der Genauigkeit halber die Lösung auf einen konstanten pH-Wert von 8 bis 8,5, der nach Angaben der Verfasser ein Optimum darstellt.

C Bestimmung:

Nach Auffüllen auf 8 ml sättigt man die Lösung mit einem Überschuss an KCl. Wenn nötig, muss der pH-Wert korrigiert werden. Dann fügt man 2 ml eines Borat-Puffers (pH 8,7) und 1 ml einerAlanin-Lösung (pHH8,7) zu. Mit 2 ml einer 0,2 m Chloramin-T-Lösung wird bei Zimmertemperatur oxydiert, die Reaktion nach 20' mit 6 ml Na-Thiosulfat gestoppt. Nach nochmaliger Sättigung mit KCl werden 10 ml Toluol zugefügt, das Glas verschlossen und 100 Mal kräftig geschüttelt. Dadurch werden die Farbreaktion störende, in Toluol lösliche andere Aminosäuren aus der Reaktionslösung entfernt, während die ersten Oxydationsprodukte des Hydroxyprolin in Toluol unlöslich sind. Nach Abpippetieren des Toluol wird das Röhrchen verschlossen, 30' lang im kochenden Wasserbad erhitzt und unter fliessendem Wasser abgekühlt. Nach nochmaliger Zugabe von 10 ml Toluol muss nochmals heftig 100 Mal geschüttelt

werden. Das entstandene Pyrrol ist nun in Toluol löslich und wird extrahiert. Zuletzt füllt man 5 ml des klaren Toluol-Überstandes in neue Röhrchen und rührt für die Farbreaktion je 2 ml Ehrlichs Reagens schnell dazu. Die Bestimmung erfolgt am Eppendorf-Photometer mit einem Filter von der Dichte 546 mμ nach unseren Erfahrungen 2' nach Hinzufügen von Ehrlichs Reagens, da der Gipfel der Farbreaktion konstant nach 2' zu beobachten war - im Gegensatz zur Literatur, wonach die Farbreaktion nach 15' abgelesen werden soll. Wir fanden jedoch nach einem Gipfel der Reaktion nach 2' einen nicht mit der Zeit proportionalen Abfall des Extinktionswertes.



II. 1) Normalwerte:

Für unsere Versuche verwandten wir zwei Mal 24 - Std. - Sammelurin, der nach Möglichkeit gleich verarbeitet, andernfalls bei 4° C wenige Tage aufbewahrt wurde. Wir konnten jedoch feststellen, daß auch nach drei Wochen noch kein Verlust an Hydroxyprolin zu verzeichnen war. Wie andere Autoren untersuchten auch wir die Patienten bei normaler Kost unter Vermeidung von gelatinereichen Nahrungsmitteln (wie Fisch) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Über den Wert einer gelatinearmen Kost findet man in der Literatur sich widersprechende Angaben.

Sjoerdsma et al (45) beobachteten große tägliche Schwankungen in der Ausscheidung von Hydroxyprolin im Urin. Auch als die Verfasser eine gelatinearme Kost verabreichten, variierten die Ausscheidungsmengen noch beträchtlich. Erst bei einer gelatinefreien Diät wurden die Schwankungen minimal, dazu verringerte sich deutlich die Gesamtausscheidung. Das Hydroxyprolin im Serum zeigte übrigens bei vergleichenden Untersuchungen fast keine Abhängigkeit von der Diät. (45). Es gelingt andererseits Prockop et al (46) zu zeigen, daß nach Gelatinezufuhr, jedoch nicht nach Zufuhr der einzelnen, in der Gelatine enthaltenen Aminosäuren, die erhöhte Ausscheidung von Hydroxyprolin im Urin nur 7 - 8 % der in der Gelatine zugeführten Hydroxyprolin-Peptidmenge beträgt.
Lenzi et al (47) sahen bei einer gelatinearmen bzw. -freien Diät keine Änderung der Hydroxyprolinausscheidung im Urin.
In einer 1961 veröffentlichten Arbeit berichten Darwin et al (48), daß erst die Zufuhr von großen Mengen von Gelatine das Hydroxyprolin im Urin ansteigen ließ. Wurde das Hydroxyprolin aus der normalen Ernährung weggelassen, so verminderte sich die Exkretion gegenüber der Ausscheidung bei Normalkost nicht, sogar bei gelatinefreier Diät blieben die Werte konstant.

Die Hydroxyprolin-Peptide, die endogen gebildet und schnell ausgeschieden werden, sind katabole Substanzen aus dem Kollagen-Stoffwechsel. Offensichtlich fehlt dem Körper ein Mechanismus, diese Substanzen zu speichern. In einer Arbeit über gastrointestinale Absorption fanden Darwin et al (48): Nach Zufuhr von Gelatine (nicht deren Aminosäure-Bestandteile als Gemisch) stieg das gebundene

Hydroxyprolin im Plasma, vielleicht durch Absorption der unveränderten Peptide, an. Die Peptide des Plasmas werden jedoch schnell ausgeschieden, denn die Ausscheidung von gebundenem Hydroxyprolin im Urin steigt ebenso nach Gelatinezufuhr an. Dabei werden die Peptide viel schnell durch die Nieren ausgeschieden als die freien Aminosäuren.
Die klassische Vorstellung der Verdauung ging bisher dahin, das vor der Absorption im Verdauungstrakt die Proteine zu Aminosäuren gespalten werden. Von Wiggans und Johnston (5o) wurde 1951 die Resorption von kleinen Mengen von Dipeptiden (Glycyl-Glycin und Glycyl-C-Leucin) bei Tieren beobachtet. Crane und Neuberger (51) konnten jedoch 196o bei Versuchen mit N 15 - markiertem Protein keine Absorption von Dipeptiden beim Menschen sehen. Sicher ist, daß das freie sowie peptidgebundene Plasma-Hydroxyprolin nach Einnahme von Hydroxyprolinen in Form von Gelatine ansteigen, und daß als Folge davon die Ausscheidung von gebundenem und totalem Hydroxyprolin im Urin erhöht ist (46).

Wir trennten zur Gewinnung unserer Normalwerte nicht in männliche und weibliche Versuchspersonen. Wenn auch Laitinen et al (22) einen statistisch signifikanten Geschlechtsunterschied in der totalen Hydroxyprolinausscheidung bei Angabe in Hydroxyprolin/24 Std. fanden, so war bei der Umrechnung auf m^2 Körperoberfläche die Signifikanz aufgehoben.

Zur Errechnung der Normalwerte untersuchten wir unter den oben angegebenen Bedingungen 17 Patienten im Alter von 21 - 7o Jahren, die hospitalisiert, aber ohne aktive Erkrankung waren, die den Kollagen-Stoffwechsel in irgendeiner Weise beeinflussen könnte.

Wir fanden einen Mittelwert von M ±σM = 27,2 ± 2,7 mg/24 Std. totalem Hydroxyprolin im Urin. Parallel dazu untersuchten wir eine Gruppe von 13 gesunden Studenten, deren Mittelwerte in der Hydroxyprolinausscheidung M ±σM = 27,8 ± 2,3 mg/24 Std. betrug. Es besteht zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied (so auch Laitinen et al (22)). Der Mittelwert der totalen Hydroxyprolinausscheidung im Urin aller Normalpersonen ist in unserer Arbeit M ±σM = 27,5 ± 1,8 mg/ 24 Std., das bedeutet, daß der wahre Mittelwert mit 68,34 % Wahrscheinlichkeit innerhalb dieser Grenzen liegt. Der Normalwert ist also 27,5 mg Hydroxyprolin/24 Std. mit einer Streubreite σ= ± 9,89 mg. Dazu Klein, Albertsen und Curtiss (26): Normalwert des totalen Hydroxyprolin im Urin bei 2o Normalpersonen = 18,6 bis 36,1 mg/die mit einem Mittelwert von 27,6 mg. Normalwerte bei Lenzi, Ravenni et al (47): 3o,4 mg/24 Std. bei F.C. Benoit (49): 38,3 ± 11,9 mg/die ♂, 27,o ± 9,2/die ♀, M. Nakagawa und T. Tanaki (52): 29,4 ± 3,2 mg/24 Std..

	Hospitalisierte Normalpersonen			Studenten
	Pat.	Diagnose	OHP/die	OHP/die
1	H.♂ 68 J.	Asthma bronch.	12,3 mg	21,o mg
2	F.♂ 51 J.	Hypertonus	24,4 mg	24,8 mg
3	G.♂ 63 J.	Parox. ES	1o,9 mg	41,o mg
4	L.♂ 52 J.	Z.B. Diabetes	13,1 mg	33,6 mg
5	J.♂ 55 J.	Z.B. Kopfschmerz	21,o mg	25,o mg
6	M.♂ 21 J.	Z.B. Magen	19,3 mg	34,8 mg
7	B.♂ 46 J.	Hypertonus	47,3 mg	17,8 mg
8	W.♀ 52 J.	Migräne	22,o mg	2o,5 mg
9	K.♀ 26 J.	o.B.	23,8 mg	2o,1 mg
1o	J.♀ 28 J.	Adipositas	33,5 mg	43,7 mg
11	P.♂ 44 J.	Hypertonus	47,6 mg	32,1 mg
12	M.♂ 47 J.	Vitium cordis	34,2 mg	23,o mg
13	D.♀ 45 J.	Z.B. Galle	19,5 mg	24,8 mg
14	N.♀ 36 J.	Z.B.Galle	29,o mg	
15	M.♂ 46 J.	Hypertonus	37,8 mg	
16	H.♂ 56 J.	Adipositas	35,o mg	
17	G.♀ 56 J.	Z.B. Diabetes	32,o mg	

2) Hyperthyreose:

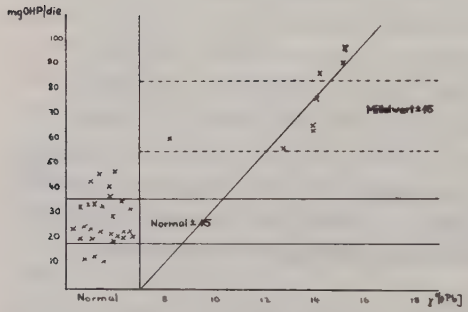
Jasin et al (32) konnten zeigen, daß eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung bei Zuständen zu finden ist, die mit dem Wachstum zusammenhängen. Erniedrigte Werte findet man bei physiologischem Stillstand oder pathologischer Störung des Wachstums.
So wie das Wachstumshormon fördert auch das Schilddrüsenhormon die Bildung der Knochen-Matrix und ihre Reifung. Dabei wirkt nach Benoit (49) das Schilddrüsenhormon mit seiner steigernden Wirkung auf den gesamten Stoffwechsel wohl über zwei Mechanismen: 1. die beschleunigte Bildung, 2. den vermehrten Abbau von Knochen-Kollagen.
Auch Kivirikko (23) beantwortet die Frage nach der Herkunft des vermehrten Hydroxyprolin bei Hyperthyreosen in der Weise, daß das freie und das totale Hydroxyprolin sowohl vom löslichen, das ist vom neugebildeten Kollagen, als auch aus dem Abbau der unlöslichen Kollagenfasern stammt, oder daß beide Mechanismen eine Rolle spielen.
An C14 - Studien bei Ratten haben die Autoren gesehen, daß das freie und totale Hydroxyprolin im Urin sowohl vom löslichen Kollagen als auch von unlöslichen Kollagenfasern stammt.
Die Methode der Hydroxyprolinbestimmung im Urin ist, da sie eine statistische signifikante Korrelation zwischen totalem Hydroxyprolin im Urin und dem proteingebundenen Jod im Serum darstellt (23), wertvoll zur Diagnostik von Hyper- und Hypothyreosen, sowie zur Therapiekontrolle.

Wir beobachteten sechs Patienten, von denen fünf eine klinisch-manifeste Hyperthyreose hatten. Das proteingebundene Jod (PBJ) war deutlich (bis maximal 15,2 γ %) erhöht. Der Mittelwert der totalen Hydroxyprolinausscheidung im Urin betrug bei

unseren Patienten 68,8 ± 4,6 mg/24 Std. Der Wert ist mit p = 0,001 statistisch signifikant erhöht. Die sechste Patientin, 45 Jahre alt, hatte keine klassischen Hyperthyreosezeichen. Der Grundumsatz war nur gering erhöht, der PBJ-Wert wurde nicht bestimmt. Es bestand klinisch eine kleine, weiche, schluckverschiebliche Struma. Die Patientin klagte über in den letzten Monaten stärker gewordene diffuse Knochenschmerzen und nachlassende Leistungsfähigkeit durch leichte Ermüdbarkeit der Armmuskulatur sowie über allgemeine Nervosität. Die totale Hydroxyprolinausscheidung im Urin war mit 52,0 bzw.53,5 mg/24 Std. deutlich erhöht. Im Szintigramm der Schilddrüse fand sich dann auch ein kleiner hyperaktiver Bezirk. Dieser Fall zeigt, daß die durch gesteigerten Stoffwechsel von Knochen- und Kollagenstrukturen hervorgerufenen Beschwerde n unter Umständen im Vordergrund einer inkretorischen stoffwechselaktiven Erkrankung stehen können.

	Patient	PBJ	OHP/die
1	B.♀ 46 J.	14,0 γ %	76,0 mg
			86,4 mg
2	P.♀ 15 J.	14,0 γ %	63,9 mg
			62,4 mg
3	P.♀ 54 J.	8,2 γ %	60,0 mg
4	P.♀ 45 J.	-	52,0 mg
			53,5 mg
5	L.♀ 68 J.	12,8 γ %	56,7 mg
6	W.♀ 63 J.	15,2 γ %	80,4 mg
			86,4 mg

HYPERTHYREOSE



Korrelationskoeffizient = 0,72
(mit Ausnahme von Fall 4)

3) Urämie:

Die hydroxyprolin-Peptide sind nicht-essentielle Substanzen, die schnell durch die Nieren ausgeschieden werden. Nach Sjoerdsma und Udenfriend (7) wird die freie Aminosäure zu 99 % tubulär rückresorbiert, 1 mg/die erscheint im Urin. Das peptidgebundene Hydroxyprolin wird nur zu etwa 80 % rückresorbiert, die tägliche Ausscheidung beträgt entsprechend etwa 25 mg/die.
Dagegen wird nach Laitinen et al (22) freies Urin-Hydroxyprolin wie jede andere Aminosäure in den Nierentubuli rückresorbiert. Die Exkretion von peptidgebundenem Hydroxyprolin kommt zustande durch tubuläre Sekretion.
Bei eingeschränkter Nierenfunktion ist entsprechend eine Retention der Peptide zu erwarten. Frimpter et al (53) fanden erhöhte Plasma-Spiegel von konjudierten Aminosäuren bei Patienten mit Urämie. Auch Prockop und Mitarbeiter (46) beobachteten eine Retention von Hydroxyprolin-Peptiden bei fortgeschrittenem Ausfall der Nierenfunktion. Mit der Retention müsste eine verminderte Hydroxyprolinausscheidung im Urin parallelgehen. Sjoerdsma und Udenfriend (7) berichten in diesem Zusammenhang über vier Patienten mit schweren Nierenstörungen, bei denen sie neben einem erhöhten Plasmaspiegel eine Verminderung der Ausscheidung von peptidgebundenem Hydroxyprolin beobachteten.

Die von uns untersuchten Patienten hatten eine aus verschiedenen Gründen eingeschränkte Nierenfunktion, das Kreatinin betrug maximal das 14-fache der Norm. Die Höhe des ausgeschiedenen Hydroxyprolin nahm in dem Maße ab wie der Kreatininspiegel anstieg. Der Durchschnitt der Hydroxyprolinausscheidung war 16,8 $\pm$ 3,5 mg/24 Std. Das bedeutet eine statistisch signifikante Erniedrigung ($p = 0,01$) gegenüber den Normalwerten.

Dafür, dass noch andere Faktoren als die renale Insuffizienz für die Erniedrigung der Hydroxyprolinausscheidung eine Rolle spielen, könnte sprechen, daß das totale Hydroxyprolin im Urin mit der Länge der Krankheit korreliert. Ein Patient mit chronischer Niereninsuffizienz aber einem nur mäßig erhöhten Kreatinin von 3,2 mg % zeigte nur eine Hydroxyprolinausscheidung von 3,7 mg/24 Std. Dieser Wert ist weit niedriger als der bei einem Kreatinin-Wert von 14,6 mg %.
In Fed. proc. (54) wird über fünf Patienten mit acidotischer Urämie berichtet mit einer Hydroxyprolinausscheidung von 2 - 19 mg/24 Std. Die Verfasser stellen zur Diskussion, ob dieser Abfall des Hydroxyprolin den systematischen Ersatz von Kollagen durch elastinartige Fibrillen anzeigt- denn Ohnsteadt et al (55) zeigten histologisch an Hautschnitten, dass eine chronische Acidose mit einem Anstieg von Fasern verbunden ist, die elastische Bestandteile enthalten (Elastose). Dagegen sprechen jedoch die oben erwähnten Befunde über erhöhte Plasma-Hydroxyprolin-Spiegel bei Niereninsuffizienz (7).

Gossmann und Mitarbeiter (56) massen bei fünf Patienten mit Urämie den Ca-Pool und mit Hilfe von Isotopen die tägliche Ca-Anbaurate. Dabei stellten sie fest, daß der Ca-Pool normal bis mäßig vergrößert war, und daß die Anbaurate pro Tag ebenfalls normal oder leicht erhöht war.
In Übereinstimmung mit ihren histologischen Befunden ergab sich das Bild einer Osteopathie mit lebhaftem Knochenumsatzz. Die verminderte Hydroxyprolinausscheidung ist demnach Ausdruck einer verminderten glomerulären Filtration. Damit ist auch die erhöhte Hydroxyprolinausscheidung von 97 und 110 mg/die in der polyurischen Phase eines

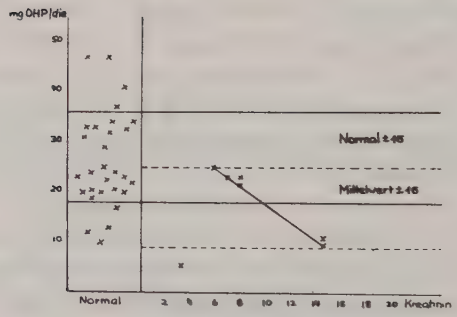
von uns beobachteten Patienten mit akutem Nierenversagen und nicht eingeschränkter glomerulärer Filtration erklärt.

	Patient	Kreatinin	OHP/die
1	L. ♂ 57 J.	7,9 mg %	23,4 mg
			22,8 mg
2	D. ♂ 55 J.	3,2 mg %	3,7 mg
3	L. ♂ 60 J.	6,9 mg %	22,0 mg
4	H. ♀ 17 J.	14,6 mg %	11,0 mg
			9,9 mg
5	E. ♀ 29 J.	5,8 mg %	24,5 mg

Akutes Nierenversagen

	Patient	Kreatinin	OHP/die
1	F. ♂ 21 J.	11,0	97,5 mg
			110,2 mg

URÄMIE



Korrelationskoeffizient = -0,97
(unter Auslassung von Fall 2)

4) Progredient chronische Polyarthritis:

Ziff et al (29) fanden nur gering erhöhte Hydroxyprolin-Werte sowohl bei rheumatoider Arthritis als auch bei anderen sogenannten Kollagenkrankheiten, während Hartmann (37) einen statistisch signifikanten Anstieg der Hydroxyprolinausscheidung bei rheumatoiden Erkrankungen beschreibt. Wir untersuchten sieben Patienten mit progredient chronischer Polyarthritis (PCP) verschieden starker Ausprägung und einer Krankheitsdauer von zwei Monaten bis zwölf Jahren. Als Kriterium für die Intesität der Polyarthritis diente der Waaler-Rose-Test. Keiner der Patienten war streng immobilisiert. Mit ansteigendem Titer stieg die Hydroxyprolinausscheidung an. Eine Ausnahme machte ein Patient mit einer seit einem Jahr bestehenden schweren PCP, der intensiv mit Cortison behandelt worden war, und dessen Waaler-Rose-Test niedriger ausfiel als es der Hydroxyprolinausscheidung entsprach.
Der Mittelwert aller Patienten lag mit 60,1 $\pm$ 5,9 mg/die mehr als doppelt so hoch wie der von Normalpersonen.

Einen sehr stark erhöhten Wert von 105,12 mg/die fanden wir bei einem 49-jährigen Patienten mit akutem rheumatischem Fieber, der infolge der Herzbeteiligung einige Tage später ad exitum kam.

Kollagenose:

Wir beobachteten einen 25-jährigen jungen Mann mit einer Kollagenose. Seine durchschnittliche Hydroxyprolinausscheidung lag zwischen 58,5 und 69,3 mg/die.

Die alkalische Phosphatase, ebenfalls ein Zeichen vermehrter Osteoblastentätigkeit, war bei einigen Patienten mit rheumatischen Erkrankungen bis

maximal 75 U/l erhöht.

Progredient chronische Polyarthritis

	Patienten	Waaler-Rose-Test	OHP/die
1	C. ♂ 28 J.	1 : 32	31,5 mg
2	S. ♂ 61 J.	1 : 512	79,2 mg
			85,8 mg
			82,8 mg
3	R. ♀ 53 J.	1 : 4000	72,0 mg
			73,6 mg
4	F. ♀ 59 J.	1 : 1024	73,6 mg
			64,0 mg
5	N. ♀ 63 J.	1 : 512	48,1 mg
			53,6 mg
6	P. ♀ 68 J.	-	31,5 mg
			26,0 mg
7	B. ♀ 63 J.	1 : 8	36,5 mg

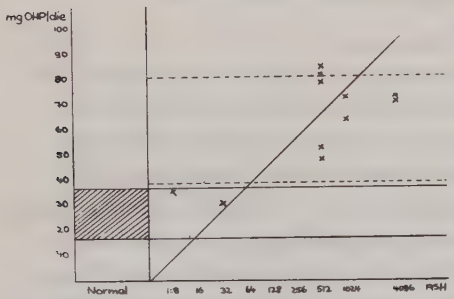
Akutes rheumatisches Fieber

	Patient	OHP/die
1	F. ♂ 26 J.	105,1 mg

Kollagenose

	Patient	OHP/die
1	S. ♂ 25 J.	69,3 mg
		58,5 mg

PROGREDIENT CHRONISCHE POLYARTHRITIS



Korrelationskoeffizient = 0,82

5) Malabsorptions-Syndrom:

Eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung bei Malabsorptionszuständen wird durch erhöhten Kollagenstoffwechsel erklärt, der in Relation zu der begleitenden Osteomalazie steht. Die"enterale Osteopathie" geht meist mit einem sekundären Hyperparathyroidismus einher (Gossmann 1966), sodaß eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung ähnlich wie beim primären Hyperparathyroidismus zu erwarten ist.

Wir beobachteten zwei Patientinnen im Alter von 58 und 47 Jahren. Bei der ersten Patientin konnte die Ursache der Malabsorption nicht geklärt werden. Die Patientin litt seit zwölf Jahren an starken Durchfällen und kam mit einem Gewicht von 27 kg hochgradig kachektisch in die Klinik. Sie kam wenige Wochen, nachdem sich schließlich ein septisches Krankheitsbild entwickelt hatte, ad exitum. Es war nicht möglich, eine weitere Diagnostik, z.B. ein Knochenstudium, zu treiben. Am wahrscheinlichsten hat es sich um eineGlutenenteropathie gehandelt.

Bei der zweiten Patientin handelte es sich um eine histologisch gesicherte primäre Amyloidose. Bei beiden Patientinnen war die Hydroxyprolinausscheidung im Urin gegenüber der Norm erniedrigt, bei der letztgenannten betrug sie 12,5 bzw. 14,2 mg/24 Std. Bei der histologischen Untersuchung der Knochenstruktur (Luoreszenz-Methode) stellte sich heraus, daß der Knochen nicht, wie oben beschrieben, osteomalazisch, sondern im Sinne einer Osteoporose verändert war. Man kann also nicht generell von einer erhöhten Hydroxyprolinausscheidung bei Malabsorption sprechen. Es kommt vielmehr darauf an, ob eine Osteopathie mit erhöhtem Knochenumsatz, insbesondere Osteomalazie mit sekundärem Hyperparathyroidismus vorliegt.

Malabsorptionssyndrom

	Patient	Diagnose	OHP/die
1	K. ♀ 58 J.	ungeklärt, seit 12 J. Durchfälle	25,4 mg
2	L. ♀ 37 J.	Prim. Amyloidose	12,5 mg 14,5 mg

6) Immobilisierte Patienten

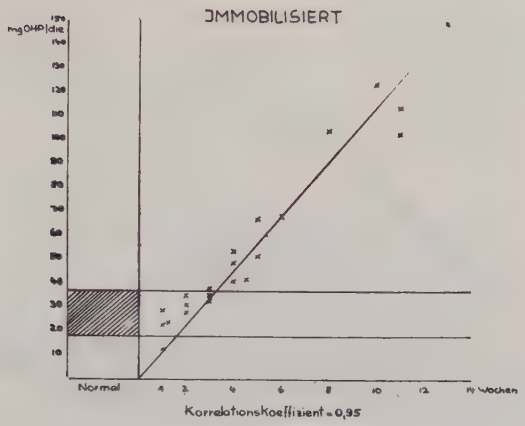
Zuletzt untersuchten wir dreizehn Patienten im Altervon 22 bis 74 Jahren, die zwischen zwei und dreizehn Wochen strenge Bettruhe einhalten mußten. Die Ursachen der Immobilisierung waren Krankheiten, die den Hydroxyprolinstoffwechsel nicht beeinflußten wie Herzinfarkt (sieben Patienten), Schrittmacher-Implantation (ein Pat.), Pleuritis (ein Pat.), Lungenembolie (ein Pat.), Tetraplegie Guillan-Barre (ein Pat.), Sepsis lenta (ein Pat.) und Endocarditis (ein Pat.).

Nach vier-wöchiger Bettruhe lagen die Durchschnittswerte der Hydroxyprolinausscheidung erstmals außerhalb des höchsten Wertes bei Normalpersonen, um mit andauernder Immobilisierung kontinuierlich anzusteigen.

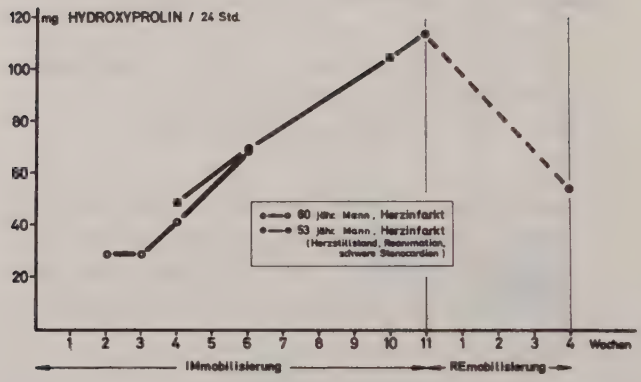
	Patienten	Diagnose	Imm.-Dauer	OHP/die
1	N. ♂ 52 J.	Herzinfarkt	1 Woche	31,3 mg
2	T. ♂ 66 J.	Schrittmacher	13 Wochen	150,9 mg
3	J. ♀ 29 J.	Pleuritis	10 Wochen	124,5 mg
4	D. ♂ 60 J.	Herzinfarkt	2 Wochen	29,3 mg
			3 Wochen	28,0 mg
			5 Wochen	41,0 mg
			8 Wochen	68,0 mg
5	F. ♂ 60 J.	Herzinfarkt	4 Wochen	49,5 mg
			10 Wochen	1o3,2 mg
			11 Wochen	114,5 mg
			4 Wo. n. Aufst.	54,0 mg
6	B. ♂ 65 J.	Herzinfarkt	1 Woche	13,0 mg
			3 Wochen	35,1 mg
7	S. ♂ 72 J.	Herzinfarkt	3 Wochen	35,2 mg
8	B. ♂ 74 J.	Herzinfarkt	5 Wochen	41,4 mg
9	H. ♂ 69 J.	Lungenembolie	4 Wochen	54,0 mg
10	J. ♂ 69 J.	Herzinfarkt	3 Wochen	24,5 mg
11	S. ♀ 22 J.	Tetraplegie	8 Wochen	104,3 mg
12	J. ♀ 24 J.	Sepsis lenta	4 Wochen	50,1 mg
13	S. ♂ 39 J.	Endocarditis	5 Wochen	67,1 mg

Der höchste Wert lag bei 150 mg Hydroxyprolin-ausscheidung in 24 Std. nach 13-wöchiger Bettruhe

(66-jähriger Mann nach Schrittmacher-Implantation wegen Adam-Stokes-Anfällen).



An zwei Patienten (Herzinfarkt) sei der Hydroxyprolinanstieg bei fortdauernder Immobilisierung dargestellt. Es handelt sich einmal um eine 6o-jährigen Patienten, der nach 6-wöchiger strenger Bettruhe plötzlich ad exitum kam, zum anderen um einen 53-jährigen Mann, der nach einem schweren Herzinfarkt elf Wochen lang streng immobilisiert war, nach einem Herzstillstand reanimiert worden war und lange unter Stenocardien litt. Nach elf Wochen war das Hydroxyprolin im Urin auf 114,5 mg angestiegen und bereits vier Wochen nach Remobilisation wieder auf 54 mg abgesunken.


mg HYDROXYPROLIN / 24 Std.
120
100
80
60
40
20
60 Jähr. Mann, Herzinfarkt
53 Jähr. Mann, Herzinfarkt
(Herzstillstand, Reanimation, schwere Stenocardien)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 1 2 3 4 Wochen
IMmobilisierung
REmobilisierung

Diskussion:

In den letzten zehn Jahren, nachdem die Bedeutung des Hydroxyprolin für die Beurteilung des Kollagenstoffwechsels erkannt war, wuchs das Interesse an dieser Aminosäure stark an. Man nimmt heute an, daß die Höhe der Hydroxyprolinausscheidung von der Größe des löslichen Kollagen-Pools, d.h. der metabolisch aktiven Kollagenvorstufen (14, 15, 16, 20) abhängig ist. Alle Prozesse also, die eine erhöhte Kollagensynthese bewirken, gehen mit einer erhöhten Hydroxyprolinausscheidung einher.
Auf der anderen Seite spricht der Nachweis von erhöhter Hydroxyprolinmenge im Urin bei Krankheiten, die mit einem erhöhten Abbau von Kollagen verbunden sind, dafür, daß die Hydroxyprolinausscheidung ebenso abhängig ist vom Abbau reifer Kollagenfasern. Wenn diese Fraktion auch sehr langsam umgesetzt wird (19), so kann sie doch in großer Menge vorhanden sein. Besonders in erwachsenen Geweben ist der Einfluß der reifen Kollagenfasern auf die Höhe des Urin-Hydroxyprolin verhältnismäßig viel größer, da sich nur noch wenig lösliches Kollagen dort findet. Die Gabe von Wachstumshormon fördert die totale Hydroxyprolinausscheidung und es ist bekannt, daß das Wachstumshormon sowohl die Neubildung von Kollagen als auch den Umsatz reifer Kollagenfasern beeinflußt. Daraus und aus Studien mit C 14 - Protein muß geschlossen werden, daß beide Mechanismen eine Rolle spielen (21). Alle den Stoffwechsel steigernden Hormone beeinflußen die Höhe des Hydroxyprolinspiegels. So das Thyroxin, das bei Hyperthyreose eine für die Diagnostik und Therapiekontrolle wertvolle Steigerung von Hydroxyprolin im Urin bewirkt.

Bei sieben Fällen von Thyreotoxikose war das

Hydroxyprolin erhöht und gab dadurch einen Hinweis auf einen Knochenumsatz. Thyroxin steigert den Stoffwechsel des Knochengewebes sehr erheblich und es ist nach diesen Ergebnissen wahrscheinlich, daß Knochenveränderungen eine regelmäßige Begleiterscheinung der Hyperthyreose darstellen. Dabei hatten nur zwei Patienten eine erhöhte alkalische Phosphatase im Serum, nur eine Patientin hatte Knochenschmerzen. Diese Beschwerden hatten hier überhaupt im Vordergrund des klinischen Bildes gestanden, und die Hydroxyprolinbestimmung war in diesem Fall ein wichtiger Hinweis zur Entdeckung eines toxischen Schilddrüsen-Adenoms.

Ebenso steigt die Ausscheidung signifikant sowohl bei exogener Zufuhr von Parathormon als auch bei Parathyroidea-Adenomen, die bereits mit Knochenläsionen verbunden sind (26). Signifikant erhöht ist die Hdroxyprolinauscheidung beo Kochenerkrankungen mit hohem Umsatz (M. Paget, Osteomalazie), während die Signifikanz bei Kollagenkrankheiten umstritten ist.

Bei progredient chronischer Polyarthritis wurden bisher von verschiedenen Autoren sich widersprechende Angaben über die Hydroxyprolinausscheidung gemacht. Wir fanden wie Hartmann (37), bei sieben Fällen von klinisch und serologisch gesicherter PCP eine signifikant erhöhte Exkretion, die bei drei Patienten mit einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase einherging. Bei einem dieser Patienten war die alkalische Phosphatase jedoch wahrscheinlich teilweise hepatogenen Ursprungs.

Während Ziff (29) keine erhöhte Ausscheidung findet, begründet Hartmann seine Ergebnisse bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie folgt:
Er nimmt an, daß in den fibrinoiden rheumatischen Frühinfiltraten vermehrt Kollagenvorstufen abgebaut

werden. Die Ansicht des Verfassers, daß die Hydroxyprolinausscheidung nur bei akutem oder nicht ganz umschriebenem Krankheitsprozess erhöht ist, entspricht unserem Ergebnis, wobei die Hydroxyprolinausscheidung mit der Höhe des Waaler-Rose-Testes anstieg. Entsprechend war auch das totale Hydroxyprolin im Urin extrem hoch bei einem Patienten mit akutem rheumatischem Fieber und bei einem jungen Mann mit akuter Kollagenose, die nicht eindeutig eingestuft werden konnte.

Bei der chronischen Niereninsuffizienz findet man niedrige Ausscheidungen, die aber relativ hoch sind gemessen an der eingeschränkten glomerulären Filtration. Es besteht hier keine Relation zwischen Hydroxyprolin und der Retention harnpflichtiger Stoffe. Über die Ursache der signifikanten Erniedrigung der Hydroxyprolinausscheidung bei Urämie gehen die Meinungen etwas auseinander. Schon über die Physiologie der Hydroxyprolin-Exkretion herrschen verschiedene Ansichten. So wird nach Sjoerdsma und Udenfriend die freie Aminosäure zu 99 % tubulär rückresosbiert, das peptidgebundene Hydroxyprolin zu 80 %. Der Rest erscheint als freies oder gebundenes Hydroxyprolin im Urin. Dagegen nimmt Laitinen eine 100-prozentige tubuläre Rückresorption und Exkretion von gebundenem Hydroxyprolin durch tubuläre Sekretion an. Beide erwarten jedoch bei eingeschränkter Nierenfunktion eine Retention und entsprechend erhöhte Plasmaspiegel, was Frimpter et al (53) und Prockop et al (46) bestätigen konnten. Vermutungen über extrarenale Komponenten äußern Finlaysen et al (54), die an einen Ersatz des Kollagen durch elastische Substanzen denken. Als Stütze dieser These könnten Ohnsteads (55) Versuche dienen, der histologisch an Hautschnitten den Ersatz kollagener Substanz durch elastinartige Fasern bei chronischer Acidose zeigten. Daß der chronische Verkauf der Urämie

der Urämie eine Rolle spielt, sahen wir an einem Patienten mit mässig erhöhtem Kreatinin, aber einer langen Krankheitsdauer, dessen Hydroxyprolin höher war als das eines Patienten mit dreifach höherem Kreatinin und kurzer Krankheitsdauer.

Dem gegenüber steht das histologische Ergebnis von vier Knochenbiopsien, die an vier urämischen Patienten durchgeführt wurden. Es zeigte in allen Fällen, daß der Knochenumsatz normal oder erhöht bei geringerer glomerulärer Filtration war. Ebenso spricht die mit Hilfe von Isotopen gemessene Ca-Anbaurate bei Urämikern (56) für einen lebhaften Knochenumsatz.

Bei den verschiedenen Malabsorptions-Syndromen kommt es meist zu einem sekundären Hyperparathyroidismus, sodaß eine erhöhte Hydroxyprolinausscheidung ähnlich wie beim primären Hyperparathyroidismus zu erwarten ist. So auch Crabbé (57). Wir fanden dagegen bei zwei Patienten mit einem Malabsorptionssyndrom, wobei es sich in einem Fall um eine gesicherte primäre Amyloidose handlete, eine gegenüber der Norm verminderte Hydroxyprolinausscheidung. Bei der histologischen Untersuchung der Knochenstruktur stellte sich heraus, daß der Knochen keine osteomalazischen, sondern osteoporotische Veränderungen aufwies (Gossmann). Bei der zweiten Patientin konnte keine histologische Knochenuntersuchung vorgenommen werden. Nach den röntgenologischen und blutchemischen Befunden lag auch hier eine Osteoporose vor.

Zur Frage der vermehrten Hydroxyprolinausscheidung bei Immobilisierten finden sich meines Wissens keine Vergleichszahlen. Im Gegensatz zur Inaktivitätsosteoporose findet man Normalwerte bei seniler Osteoporose. Warum die senile und die Inaktivitätsosteo-

porose verschiedene Auswirkungen auf die Hydroxyprolinausscheidung haben behandeln Smith und Nordin (58), die damit zugleich di e nicht einheitlichen Ergebnisse bezüglich der Hydroxyprolinausscheidung im Urin bei verschiedenen Osteoporoseformen (ausgenommen Inaktivitätsosteoporose) erklären. Nach Smith und Nordin (58) ist die Höhe der Hydroxyprolinausscheidung bei der Osteoporose abhängig vom Ausmaß der negativen Ca-Bilanz, die die Höhe der Knochenresorption widerspiegelt. Bei Verminderung der Knochenresorption durch Ca-Gabe fällt das Urin-Hydroxyprolin ab. Bei Osteoporosen mit noch positiver Ca-Bilanz ist die Hydroxyprolinausscheidung am geringsten. Mit Hilfe von Isotopen konnte ein direktes Verhältnis von der Knochenresorptionsrate zur Höhe des Hydroxyprolin im Urin aufgestellt werden. Die Verfasser nehmen an, daß die Hydroxyprolinausscheidung mehr die Knochenresorption reflektiert als die Knochenneubildung, wie Klein et al (26) vermuten. Wenn in Fällen mit hoher Knochenbildungsrate das Hydroxyprolin im Urin hoch ist, so ist doch in solchen Fällen die Abbaurate ebenso erhöht.

Es scheint also, daß die in der Literatur verschieden hohen Angaben um die Hydroxyprolinausscheidung bei Osteoporosen [(22), (47), (58), (59) geringe Reduktion oder Normalwert; (47), (58), (60) geringe Erhöhung. Hioco (61): Leichte Vermehrung des Hydroxyprolin im Urin bei primärer Osteoporose, besonders bei idiopathischer Osteoporose jüngerer Patienten. Bei den meisten Untersuchten blieb jedoch der Hydroxyprolinwert im Urin innerhalb der Norm] abhängig sind vom Verhandensein und dem Ausmaß einer negativen Ca-Bilanz. Entsprechend ist die Immobilisations-Osteoporose eine Erkrankung mit hohem Knochenumsatz.

Fontaine (zit. nach Willert (62)) nannte das Frühstadium der Inaktivitätsosteoporose "rote Osteoporose" wegen der starken Hyperämie des Knochengewebes. Willert zeigt mikroskopische Bilder, die einen erhöhten Knochenan- und -abbau bei Immobilisationsosteoporose demonstrieren. Man spricht dabei von der "Osteoklasten-Osteoporose", weil die Aktivität der Osteoklasten die der Osteoblasten überwiegt. Heaney (63) wies durch Untersuchungen mit markiertem Calcium nach, daß die Anbaurate um das zweifache, die Abbaurate um das dreifache gesteigert ist. Dieses Stadium des vermehrten Abbaus soll Wochen bis Monate dauern, dann in ein Stadium verminderten Anbaues übergehen, worauf sich schließlich der Prozeß auf einem neuen Niveau, dem der Atrophie, stabilisiert.

Die hohe Hydroxyprolinausscheidung bei unseren immobilisierten Patienten paßt zu der Vorstellung, daß es sich bei der Immobilisationsosteoporose um eine Osteopathie mit hohem Knochenumsatz handelt und widerspricht der ursprünglichen Auffassung von Albright und Reifenstein (64), daß nur eine verminderte Osteoblastenaktiviät vorliegt. Die Inaktivitätsosteoporose unterscheidet sich also deutlich von der Altersosteoporose.

Zusammenfassung:

Nach der Methode von Prockop und Udenfriend bestimmten wir bei insgesamt 45 Patienten mit Hyperthyreose, Urämie, Malabsorptions-Syndrom, progredient chronischer Polyarthritis, akutem rheumatischem Fieber und einer Kollagenose sowie bei aus unspezifischen Gründen immobilisierten Patienten die Hydroxyprolinausscheidung im Urin. Dabei liessen sich folgende Untersuchungsergebnisse feststellen:
Bei sechs beobachteten Patienten mit Hyperthyreose stieg die Hydroxyprolinausscheidung proportional mit der Höhe des PBJ an. Der Mittelwert war statistisch signifikant gegenüber den Normalwerten erhöht.

An fünf Urämikern liess sich das umgekehrt proportionale Verhalten der Hydroxyprolinausscheidung zur Schwere der Niereninsuffizienz, gemessen am Kreatininwert, nachweisen. Der Durchschnitt der Hydroxyprolinausscheidung war statistisch signifikant erniedrigt. Bei Niereninsuffizienz ist also durch verminderte glomeruläre Filtration trotz erhöhtem Kollagenumsatz die Ausscheidung erniedrigt.
Bei siebeh Patienten mit progredient chronischer Polyarthritis war die Hydroxyprolinausscheidung statistisch signifikant erhöht.
Es zeigte sich, daß beim Malabsorptionssyndrom der Kollagenumsatz und damit die Hydroxyprolinausscheidung nur erhöht ist, wenn eine Osteomalazie vorliegt, während beides bei einer Osteoporose nicht erhöht zu sein braucht.
Bei dreizehn Patienten, die zwischen zwei und dreizehn Wochen strenge Bettruhe einhalten mußten, war das Hydroxyprolin im Urin nach dreizehn Wochen

auf maximal 150 mg/die angestiegen und ging vier Wochen nach Remobilisierung deutlich zurück. Bei der Interpretation erhöhter Hydroxyprolinausscheidung ist diese Feststellung zu berücksichtigen.

Literatur (Anmerkungen)

1. Bear , Adv. Prot. Chem. 7,69 (1952)

2. Neumann R.E. und Logan M. A.:
"The Determination of Hydroxyproline"
J. biol. Chem. 184, 299 (1950)

3. Stein W. H. und Miller E. G.:
"The Composition of Elastin"
J. Biol. Chem. 125, 599 (1938)

4. Stetten M.R.:
"Some Aspects of the Metabolism of Hydroxyproline,
studied with the Aid of Isotopic Nitrogen"
J. Biol. Chem. 181,31 (1949)

5. Prockop D., KaplanA., Udenfriend S.:
"Oxygen-18-Studies on the Conversion of Proline
to Collagen-Hydroxyproline"
Archieves of Biochemistry and Biophysics 101, 499-503 (1963)

6. Peterkofsky B., Udenfriend S.:
"Conversion of Proline to Collagen Hydroxyproline in
a cell-free System from chick Embryo"
J. Biol. Chem. 238, 3966 (1966)

7. Sjoerdsma A., Udenfriend S., Keiser H., Le Roy Carwile:
"Hydroxyproline and Collagen Metabolism"
Annales of Internal Medicine 63 No 4, Okt. 1965

8. Bear,Adv. Prot. Chem. 7,69 (1952) zit. nach Leuthardt,
Lehrbuch der Physiol. Chemie, 1961

9. H. E. Firschein:
Arch. Biochem. und Biophys. 119, 119 (1967)

10. Jackson D. S., Bentley J. P.:
"On Significance of Extractable Collagen"
J. Biophys. und Biochem. Cytol. 7, 37 (1960)

11. Lindtstedt S., Prockop D.J.:
J. Biol. Chem. Vol 236, 1399 (1961)

12. Martin G.R., Mergenhagen S.E., Prockop D.J.:
Nature 1961, Vol 191, 1008

13. Ziff M., Kibrick A., Dresner F., Gribetz H.J.:
J. Clin. Invest. Vol. 35, 579 (1956)

14. Jasin H.E., Fink C., Wise W., Ziff M.:
J. Clin. Invest. 1962 (in press, übernommen von Jasin H.S., Ziff M.):
"Relationship between Soluble Collagen and Urinary Hydroxyproline in the Lathyritic Rat."
Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine. Vol. 110, S. 837 (1962)

15. Gross, J.:
J.Exp. Med. Vol. 107, 265 (1958)

16. Banfield W.:
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Vol. 97,309 (1958)

17. Kao K.T., Mc. Gavack T.H.:
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Vol. 101, 153 (1959)

18. Levence C.T., Gross J.:
J. Exp. Med. Vol. 110, 771 (1959)

19. Dasler W., Stoner R.F. Milliser R.V.:
Metabolism 10, 883 (1961)

20. Harkness R.D., Marko A.M., Helln M. Muir and A. Neuberger:
"The Metabolism of Collagen and other Proteins of the Skin of Rabbits"
Bioch. J. 56, S. 558 (1954)

21. Kowalewski K.:
"Effect of Growth Hormone and of an Anabolic Steroid on Excretion of Hydroxyproline in the Urine of Rats".
Acta Endecrinologica 50, 321 - 328 (1965)

22. Laitinen O., Nikkilä E.A. and Kivirikko K.J.:
"Hydroxyproline in the Serum and Urine. Normal Values and Clinical Significance"
Acta Medica Scandinavica Vol. 179, 3 (1966)

23. Kivirikko K.J., Laitinen O., Lamberg B.-A.:
"Value of Urine and Serum Hydroxyproline in the Diagnosis of Thyroid Disease"
J. Clin. Endicrinolog. and Metabolism
Vol. 25, No 10, Oct. 65, p. 1347 - 1352

24. KeiserH.R., Gill J.R. jr., Sjoerdsma A., Bartter F.C.:
"Relation between Urinary Hydroxyproline and Parathyroid Function".
Journal for Clinical Investigation Vol. 43,6 (1964)

25. Gossmann H.H., Baltzer G., Helms H.:
"Ca-Stoffwechsel bei chronischer Niereninsuffizienz. Histologische Befunde am Knochen".
Klin. Wochenschrift, in Druck

26. Klein Le Roy, Albertsen Kai, Curtiss P.H. jr.:
"Urinary Hydroxyproline in Hyperparathyroidism"
Metabolism, Vol. 11 No 9, 1023 -1027 (1962)

27. Rasmussen H.:
"Parathyroid Hormone.
Nature an Mechanism of Action".
Am. J. Med. 39, 112 (1961)

28. Johnston C.C., jr. and Deiss W.P. jr.:
"Parathyroid Hormone and Urinary Hydroxyproline"
Metabolism, Vol. 14 No 4 (1965)

29. Ziff M. Kibrick A. , Dresner E., Gribetz H.J.:
"Excretion of Hydroxyproline in Patients with Rheumatic and Nonrheumatic Diseases"
J. Clin. Invest. 35, 579 (1956)

30. Dull T.A., Lynn Causing, Philipp H. Hennemann:
"Urinary Total Hydroxyproline as an Index of Connective Tissue Turnover in Bone"
Proceedings of the Fifty-Fourth Annuel Meeting of the American Society for Clinical Investigation.
Held in Atlantic City, N.Y. April 30, 1962

31. U. Langness und H. Behnke:
Die Hydroxyprolinausscheidung im Urin bei Osteogenesis Imperfecta.
Klin. Wschr. Jg. 44, Heft 22, 1966 S. 1294-1297

32. Jasin H.E., Fink C.W., Wise W., Ziff M.:
"Relationship between Urinary Hydroxyproline and Growth"
Journal of Clinical Investigation Vol. 41, No 10 (1962)

33. Bauer, K.H.:
"Über Osteogenesis Imperfecta. Zugleich ein Beitrag zur Frage einer allgem. Erkrankung sämtlicher Stützgewebe"
Dtsch. Z. Chir. 154, 166 (192^{0})

34. Folis R.H.:
"Osteogenesis imperfecta congenita, a Connective Tissue Diathesis"
J. Pediat. 41, 713 (1952)

35. Dull T.A., Hennemann P.H.:
"Urinary Hydroxyproline as an Index of Collagen Turnover in Bone"
The New England Journal of Medicine 268, 1 S. 132 (1963)

36. Warren, D, Platt, Lawrence H. Doolittle and James W.S.Hartshorn:
"Urinary Hydroxyproline Excretion in metastatic Cancer of Bone"

37. Fre d Hartmann:
Die Hydroxyprolinausschetdung im Urin von Normalpersonen und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen.
Klin. Wschr. 44, Heft 18, 1966 S. 1053 -1058

38. Lang K.Z.: Physiol.Chem. 219 (1933) 1948
Neumann, R.E., and Logan, M.A.: Biol. Chem. 184 (50) 299

39. Mitomen, C., Smith, T.E., Davidson, J.D., Udenfriend, S., Da Costa, F.M. and Sjoerdsma, A.J.:
Lab. Clin. Med. 53, 970 (1959)

40. Stegemann, H.Z.:
Physiol. Chem. 311, 41 (1958)

41. Grumbaum, B.W. and Glück, D.:
Arch. Biochem. Biophys. 65, 260 (1956)

42. Hutterer and Singer E.J.:
Anal. Chem. 32, 556 (1960)

43. Darwin, J. Prockop and Sidney Udenfriend:
"A specific Method for the Analysis of Hydroxyproline in Tissues and Urine"
Analytical Biochemistry, 1, 228 - 239 (1960)

44. Corwin, A.H.:
"Heterocyclic Compounds"
(R.C. Elderfield, ed.) vo. 1, p. 277
Wiley and Sons, New York 1950

45. Sjoerdsma A., Udenfriend S., Keiser H., Carwile Le Roy:
"Hydroxyproline and Kollagen Metabolism"

46. Prockop, J.D., Keiser, H.R., Sjoerdsma A.:
"Gastrointestinal Absorption and Renal Excretion of Hydroxyproline Peptides"
Lancet II, S. 527 (1962)

47. F. Lenzi, G. Ravenni, M. Rubegni, C. Del Giovane:
" The Significance of Urinary Hydroxyproline in Osteoporosis"
Panminerva Medica Vol 5 No 6 (1963)

48. Darwin J. Prockop, Albert Sjoerdsma:
"Significance of Hydroxyproline in Man"
Journal of Clinical Investigation 40, 1 S. 843 (1961)

49. Frederick C., Benoit, George B.Theil, Raymond H. Watten:
"Hydroxyproline Excretion in Endocrine Disease"
Metabolism 12 No 12, 1072 - 1082 (1963)

50. Wiggans and Johnston 1951

51. Crane and Neuberger 1960

52. Masashi Nakagawa et Tokiya Tamaki:
Urinary Hydroxyproline Excretion in Orthopedic Disease.
Nagoya J. Med. Sci. 27, 228 -235 (1966)

53. Frimpter G.W., Thompson D.D. Luckey E.H.:
J. Clin. Invest. 40, 1208 (1961)

54. G.R. Finlayson, J. Graham Smith jr., M.J. Moore,
W. Mitchell Sams jr.:
"Elastosis and decresed Urinary Hydroxyproline in chronic Acidosis"
Fed. Proc. 22, 1/13 (1962)
47th annual Meeting April 16 - 20 (1963) of Federation of American Societies for Experimental Biology

55. Ohnstead and Unseth:
Arch. Derm. 77, 304 (1 958)

56. Gossmann, H.H., Schaumlöffel, E., Habermehl, A., Baltzer, G., Graul, E.H.:
"Bilanzstudien und 47 Ca-Kinetik bei chronischer Niereninsiffizienz."
Klin. Wschr. in Druck

57. Paul Crabbé, Kurt J. Isselbacher:
"Urinary Hydroxyproline Excretion in Malabsorption Statea"
Gastroenterologie, Vol 48 No 3, S. 307 ff (1965)

58. Smith D.A. and Nordin B.E.C.:
Proceedingsof the Royal Society of Medicine, Vol. 57,
S. 868 - 870, Sept. 64
"The Relation between Calcium- Balance and Hydroxyproline
Excretion in Osteoporosis".

59. Klein l., Lafferty W., Peason O.H. and Curtiss P.H. jr.:
"Correlation of Urinary Hydroxyproline, Serum Alkaline
Phosphatase and Skeletal Calcium Turnover"
Metabolism Vol. 13 No 3, S. 272 - 283 (1964)

60. Young M.M., Nordin B.E.C.:
Effects of Natiral and Artificial Menopause on Plasma and
Urinary Calcium and Phosphorus.
The Lancet, 1967 15 July S. 118.

61. Hioco D., Gruson M., Ryckewaert A. et de Séze:
Interet et Signification de L'hydroxyproline Urinaire
dans les Maladies Osseuses.
La Semaine des Hopitaux 42^{e} année n^{o} 42/7, 14 Octobre 1966
pp 2497 -2502

62) Willert H.E.:
"Immobilisationsosteoporose"
Melsunger med. Mitteilungen, Dand 40, S. 123, 1966

63. Heaney, R.P.:
Radiocalcium Metabolism in Osteoporosis in Man.
Am. J. Med. 33, 188 (1962)

64. Albright F. und Reifenstein jr.:
"The Parathyroid Glands and Metabolic Bone Disease"
Baltimore 1948

Lebenslauf:

Am 5. 8. 1940 wurde ich als erste Tochter des Weingärtners Michael Kovarik und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Weisz, in Preßburg, Tschechoslowakei, geboren.
Vier Jahre lang besuchte ich die Volksschule in Neuenhain/Taunus.
Nach dem Abitur am Realgymnasium in Frankfurt-Höchst begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Frankfurt, wechselte im siebenten Semester nach Marburg/Lahn und ging im neunten Semester wiederum nach Frankfurt.
Dort legte ich nach dem elften Semester die ärztliche Prüfung ab.
Vom 1. 5. 1966 bis 30. 4. 1968 war ich in Marburg, Aalen/Württemberg, Würzburg und Bad Nauheim als Medizinalassistentin in den verschiedenen Disciplinen tätig.
Seit dem 1. 5. 1968 bin ich Assistentin an einem klinischen Sanatorium in Bad Nauheim.

Meine akademischen Lehrer waren folgende
Herren Professoren und Dozenten:

In Frankfurt

Artelt, Altmann, Adebahr, Betke, Brehm, Böhle,
Czerny Christ, Dänzer, Degkwitz, Duus, Frick,
Fischer, Frowein, Frey, Giersberg, Greven, Güntz,
Gerchow, Göggel, Halbsguth, Heinz, Hübener, Holtz,
Heller, Herzberg, Hermann, Hellriegel, Hoff,
Heintz, Hirsch, Jantz, Kramp, Kummer, Krücke,
Kulenkampff, Kootz, Lapp, Leiber, Lieb, Leonhardi,
Luff, Müser, Martin, Mittermaier, Ortmann, Otto,
Pirlet, Pfeiffer, Palm, Royen, Ried, Rosenstock,
Roka, Rotter, Radenbach, Rossberg, Rajewsky,
von Reckow, Starck, Schmitt-Neuroth, Schroeder,
Schmith, Schümann, Straad, Schöffling, Schoberth,
Schwenzer, Thiel, Ungeheuer, Wieland, Wezler, Weiße, Zutt.

In Marburg

Braun-Falco, Gedigk, Huber, Hartmann, Hildebrand,
Linneweh, Martini, Neubauer, Schwaiger, Schölmerich,
Stender, Schmid, Siegert, Streicher, Salfeld, Würterle.

Herrn Professor Dr. med. Martini, Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn, danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas während meiner Medizinalassistentenzeit an seiner Klinik.